家蚕 miRNA Novel-31* 上调溶血素基因的表达

施莉莉[1], 耿　涛[1], 吴　萍[1], 潘中华[2], 覃光星[1],
高　坤[1], 侯成香[1], 郭锡杰[1,*]

(1. 江苏科技大学生物技术学院, 江苏镇江 212018; 2. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏苏州 215123)

摘要:【目的】Novel-31* 是在家蚕质型多角体病毒(*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, BmCPV) 感染的家蚕中发现的一个差异表达 miRNA。本研究旨在验证 Novel-31* 对其靶基因表达的调控作用,以便进一步研究 miRNA 及其靶基因在昆虫免疫调节中的作用。【方法】用生物信息学方法预测 Novel-31* 的靶基因,荧光定量 PCR 分析 Novel-31* 及其靶基因在家蚕感染 BmCPV 后不同时间点的表达变化;构建 miRNA 慢病毒表达载体和靶基因慢病毒表达载体,转染 293T 细胞,同时合成 Novel-31* mimics 转染家蚕培养细胞 BmN,使用荧光定量 PCR 检测 Novel-31* 对靶基因表达的调控作用。【结果】生物信息学方法预测发现,溶血素基因是 Novel-31* 的靶基因,其结合位点位于溶血素基因的 5′ UTR 区域。荧光定量 PCR 分析表明,Novel-31* 及溶血素基因在感染 BmCPV 的家蚕血淋巴细胞中呈现明显的上调表达。荧光定量 PCR 检测表明,在 Novel-31* 慢病毒表达载体和溶血素基因 5′UTR 慢病毒表达载体转染的 293T 细胞中和在转染 Novel-31* mimics 的家蚕 BmN 细胞中,溶血素基因都上调表达。【结论】溶血素基因是 miRNA Novel-31* 的靶基因, Novel-31* 与溶血素基因 5′UTR 结合,上调溶血素基因的表达。

关键词: 家蚕; miRNA; Novel-31*; 靶基因; 慢病毒载体; 溶血素

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2016)07-0724-08

microRNA Novel-31* up-regulates the expression of hemocytin gene in the silkworm, *Bombyx mori*

SHI Li-Li[1], GENG Tao[1], WU Ping[1], PAN Zhong-Hua[2], QIN Guang-Xing[1], GAO Kun[1], HOU Cheng-Xiang[1], GUO Xi-Jie[1,*] (1. School of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China; 2. School of Biology and Basic Medical Science, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

Abstract:【Aim】Novel-31* is one of the miRNAs identified in the silkworm (*Bombyx mori*) larvae infected by *B. mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV). This study aims to predict its target genes and verify its function in regulation of target gene expression, so as to further study the roles of miRNAs and their target genes in insect immune regulation. 【Methods】The putative target genes of miRNA Novel-31* were predicted by bioinformatics approach, and the expression patterns of Novel-31* and the predicted target gene were detected using real-time quantitative PCR at different time points in the silkworm larvae infected by BmCPV. Lentiviral expression vectors respectively expressing Novel-31* and the target gene were constructed and transfected into 293T cells. At the same time, Novel-31* mimics was synthesized and transfected into silkworm cell line BmN. The regulation of Novel-31* on target gene expression was verified by real-time quantitative PCR. 【Results】Bioinformatics analysis predicted that hemocytin gene is one of the putative target genes of Novel-31* and its 5′ UTR region is the binding site for Novel-31*. Real-time quantitative PCR analysis indicated that the expression levels of both Novel-31*

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2012CB114605)

作者简介: 施莉莉, 女, 1989 年 7 月生, 江苏宿迁人, 硕士研究生, 研究方向为家蚕分子病理学, E-mail: sllpig@ sina. com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: guoxijie@ 126. com

收稿日期 Received: 2016-04-06; 接受日期 Accepted: 2016-06-05

and the hemocytin gene were up-regulated obviously in the hemolymph of silkworm larvae infected with BmCPV. Lentiviral expression vectors respectively expressing Novel-31* and the 5′ UTR region of hemocytin gene were successfully constructed and transfected into 293T cells. Real-time quantitative PCR detection verified that Novel-31* up-regulated the target gene expression. Furthermore, transfection of Novel-31* mimics into silkworm cell line BmN also resulted in the up-regulation of expression of the hemocytin gene.【Conclusion】Hemocytin gene is a target gene for miRNA Novel-31*. Novel-31* can bind to the 5′ UTR region of the target gene and up-regulate obviously its expression.
Key words: *Bombyx mori*; miRNA; Novel-31*; target gene; lentiviral expression vector; hemocytin

微小 RNA(miRNA)是一类内源性非编码的单链 RNA 分子,长度约 20~25 bp,由一段具有发夹结构的单链 RNA 分子前体(pre-miRNA)剪切后生成(Ambros, 2004)。miRNA 通过与 mRNA 的结合,调控生物的多种生理过程(Carrington and Ambros, 2003)。家蚕 *Bombyx mori* 为鳞翅目昆虫,是我国重要的经济昆虫,是研究生物发生、分化、生长发育以及调节、遗传和变异的模式生物之一(Willis *et al*., 1995)。在家蚕的各个发育时期已发现大量 miRNA(Cao *et al*., 2008; He *et al*., 2008; Yu *et al*., 2008),表明家蚕的 miRNA 对家蚕生长发育起到重要的调控作用(刘悦,2013)。本实验室前期研究中对家蚕质型多角体病毒 *B. mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV)感染的家蚕中肠进行 Solexa 测序发现数条新的 miRNA,这些新的 miRNA 呈现差异表达(Wu *et al*., 2013)。本研究选择其中一条新发现的 miRNA Novel-31*,经生物信息学分析发现溶血素(hemocytin)基因可能是其靶基因。家蚕溶血素是典型的 C 型昆虫凝集素,与血管性血友病因子具有同源性(Kotani *et al*., 1995),C 型凝集素在免疫系统识别病原体方面发挥重要作用(Rao *et al*., 2015)。Arai 等(2013)研究发现家蚕溶血素可由家蚕粒细胞产生,参与家蚕免疫中的结节作用,是胞间纤维结构的重要组成部分。鳞翅目昆虫凝集素主要是在幼虫-蛹阶段发挥作用(蒋芸芸,2006)。本研究主要通过构建慢病毒表达载体,在细胞内验证 miRNA Novel-31* 对靶基因家蚕溶血素基因表达的调控作用,以期进一步研究 miRNA 在昆虫抗病毒免疫中的作用及其机制。

1　材料与方法

1.1　材料

家蚕品种 P50 及家蚕质型多角体病毒(BmCPV)由中国农业科学院蚕业研究所家蚕病理室保存。293T 细胞由福建师范大学南方医学研究中心陈骐教授惠赠。家蚕 BmN 细胞由本实验室保存。慢病毒载体 pLKO. 3G 以及包装质粒 pMD2. G 和 pSPAX2 购自 Addgene 公司,慢病毒载体 pLNHX 和包装质粒 pVSV-G 由本实验室保存。家蚕 miRNA Novel-31* mimics 及阴性对照(negative control, NC)由苏州吉玛基因股份有限公司合成。miRNA 转染试剂 NEOFECT™ siRNA Transfection Reagent 购自零客创智北京生物科技有限公司。总 RNA 提取试剂盒、T4 连接酶、Taq 聚合酶及转染试剂 GenFectin 购自北京博凌科为生物科技有限公司。限制性内切酶购自 Thermo Scientific™ 公司。RNAiso for Small RNA 试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)及反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)购自 TaKaRa 公司。DMEM 培养基购自 Gibco™ 公司。胎牛血清 FBS 购自 Sigma 公司,TC100 昆虫培养基购自 AppliChem GmbH 公司。引物合成及测序由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2　Novel-31* 靶基因预测

使用 NCBI (http://www. ncbi. nlm. nih. gov/) Blast 功能及 RNA Hybird 软件预测 Novel-31* 的靶基因。我们前期研究中测定的 miRNA Novel-31* 序列为 CTATACACTACCGTTACCGGC (Wu *et al*., 2013),根据 miRNA 种子序列与靶基因配对情况以及 miRNA 与靶基因结合自由能(低于 −20 kcal/mol)筛选候选靶基因。

1.3　家蚕接种感染 BmCPV 及组织收集

取家蚕 P50 5 龄第 1 天幼虫 200 头,分为实验组与对照组。实验组将病毒多角体悬浮液涂布于桑叶上饲喂家蚕幼虫,待添毒叶食净后改饲正常桑叶,平均每头蚕饲喂感染约 80 万个 BmCPV 多角体,对照组添食等量生理盐水。分别于感染后 6, 12, 24, 48, 72 和 96 h 收集两组家蚕中肠及血淋巴。每个时间点解剖 15 头蚕,每 5 头为一组,实验组与对照组分别设置 3 个重复。样品保存于 −80℃ 备用。

1.4 Stem-loop qRT-PCR 检测家蚕 Novel-31* 的表达

根据 TaKaRa 公司的 RNAiso for Small RNA 试剂盒说明书提取家蚕中肠组织及血细胞的小 RNA，用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit 及特异性反转录引物进行反转录，按照荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II 说明书，采用 Stem-loop qRT-PCR 检测 Novel-31* 的表达（Chen *et al.*, 2005）。实验均设 3 个重复，家蚕 U6 snRNA 作为 miRNA 定量表达分析内参基因，反应条件：95℃ 预变性 10 min，95℃ 变性 15 s，61℃ 退火 31 s，45 个循环进行扩增。N-31* 反转录特异性引物为：CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGCCGGT。Stem-loop qRT-PCR 引物分别为：N31*-F：5′-ACACTCCAGCTGGGCTATACACTACCGT-3′；N31*-R：5′-TGGTGTCGTGGAGTCG-3′。U6-F：5′-CGTATACTAAAATTGGAACGATACAG-3′；U6-R：5′-ATTTTGCGTGTCATCCTTGC-3′。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析数据（Livak and Schmittgen, 2001）。

1.5 慢病毒表达载体构建

1.5.1 Novel-31* 慢病毒表达载体构建：以家蚕 miRNA cDNA 为模板，设计合成 Novel-31* 前体序列 AATTCTATACACTACCGTTACCGGCCTCGAGGCCGGTAACGGTAGTGTATAGTTTTTTTAT 及其反义链 AAAAAAACTATACACTACCGTTACCGGCCTCGAGGCCGGTAACGGTAGTGTATAG（其中 Novel-31* 序列为 CTATACACTACCGTTACCGGC），体外退火形成双链，与经 *Eco*R I 及 *Pac* I 双酶切的空质粒 pLKO. 3G 相连，通过双酶切验证及测序证明连接正确，将该 Novel-31* 慢病毒表达载体命名为 pLKO. 3G-miR-N31*。

1.5.2 溶血素基因 5′UTR 慢病毒表达载体构建：根据预测的溶血素基因（GenBank 登录号：NM_001111347. 1）5′非翻译区 Novel-31* 的结合序列，设计并合成一对引物 UTR-F 及 UTR-R，以家蚕 cDNA 为模板，扩增出溶血素基因 5′UTR 序列，与 GST 标签链接。双酶切纯化 PCR 产物，与经 *Not* I 和 *Bam*H I 双酶切的 pLNHX 空质粒连接，通过双酶切验证及测序表明连接正确，并将该溶血素基因 5′UTR 慢病毒表达载体命名为 pLNHX-UTR-GST。引物序列如下：UTR-F：5′-GCGGCCGCATACCAAATTAAAAAT-3′；UTR-R：5′-GTCGACTGGAAGTCGGAATCCGCT-3′。GST-F：5′-GTCGACGATGTCCCCTATACTAGG-3′；GST-R：5′-GGATCCTTAATCCGATTTTGGAGGATG-3′。下划线部分分别为限制性内切酶 *Not* I，*Sal* I 和 *Bam*H I 酶切位点。

1.6 重组质粒 pLNHX-UTR-GST 及 pLKO. 3G-miR-N31* 转染 293T 细胞

转染前 1 d 将 293T 细胞分到 60 mm 细胞培养皿中，确保细胞密度 50% ~60%，根据转染试剂 GenFectin™ 使用说明书进行转染。具体实验操作如下：取 10 μg 重组质粒 pLNHX-UTR-GST 及包装质粒 pVSV-G 加入到 200 μL 150 mmol/L NaCl 溶液，充分混匀；取 4 μL 转染试剂 GenFectin™ 加入 200 μL 150 mmol/L NaCl 溶液中，室温放置 5 min；将上述两种溶液混匀，室温放置 15 min；然后将上述混合物逐滴加入细胞培养皿中，轻轻混匀，24 h 后更换新鲜的 DMEM 培养基。分别于 24 及 48 h 后收集细胞，抽提总 RNA，使用 qRT-PCR 检测转染结果。将转染成功的 293T 细胞分为对照组和实验组，实验组转染重组质粒 pLKO. 3G-miR-N31* 10 μg、包装质粒 pMD2. G 7. 5 μg 及 pSPAX2 2. 5 μg，对照组转染空质粒 pLKO. 3G 10 μg、包装质粒 pMD2. G 7. 5 μg 及 pSPAX2 2. 5 μg。24 h 后观察绿色荧光蛋白 EGFP 在 293T 细胞中的表达情况，分别在 24 和 48 h 收集细胞，使用荧光定量 PCR 检测 Novel-31* 对靶基因溶血素的表达调控。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测溶血素基因及 GST 标签的表达

根据北京博凌科为生物有限公司总 RNA 提取试剂盒说明书提取试验样品（家蚕中肠、血淋巴、293T 细胞以及 BmN 细胞）总 RNA，用反转录试剂盒 PrimeScript™ RT Reagent Kit 进行反转录反应。按照荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II 说明书进行 qRT-PCR。实验均设 3 个重复，内参为家蚕 *β-actin* 基因或新霉素基因 *Neo*。反应条件：95℃ 预变性 10 min，95℃ 变性 15 s，61℃ 退火 34 s，45 个循环进行扩增。依据 NCBI 上登录的家蚕 *β-actin*（GenBank 登录号：NM001126254. 1）、家蚕 *hemocytin*（GenBank 登录号：NM_001111347. 1）基因的翻译区序列以及 pGEX-KG 载体上的 *gst* 基因序列和 pLNHX 载体上的新霉素基因 *neo* 序列，采用 Primer 5. 0 软件设计荧光定量 PCR 引物分别为：βactin-F：5′-CCGTATGCGAAAGGAAATCA-3′；βactin-R：5′-TTGGAAGGTAGAGAGGGAGG-3′。hemocytin-F：5′-AGCCGCTACCCAAACCTAAT-3′；hemocytin-R：5′-CGGTCTCTTTCGGAGTCTTG-3′。neo-F：5′-CGACCACCAAGCGAAACATC-3′；neo-R：5′-TGATATTCGGCAAGCAGGCA-3′。gst-F：5′-GTGCAACCCACTCGACTTCT-3′；gst-F：5′-TCTGCACGCTCTTTTGG

ACA-3′。采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析数据（Livak and Schmittgen, 2001）。

1.8 Novel-31* mimics 转染家蚕 BmN 细胞

将合成的 Novel-31* mimics 转染家蚕 BmN 细胞，定量检测溶血素基因的表达变化。合成的 Novel-31* mimics 正义链：CUAUACACUACCGUUACCGGC；反义链：CGGUAACGGUAGUGUAUAGUU；阴性对照（NC）正义链：UUCUCCGAACGUGUCACGUTT；阴性对照反义链：ACGUGACACGUUCGGAGAATT。转染具体步骤：转染前 1 d 将 BmN 细胞接种到 6 孔板中，确保细胞密度 50% ~60%。取适量 DEPC 处理水溶解干粉状 mimics 及 NC，浓度为 20 μmol/L。转染前取 6 μL 转染试剂 NEOFECT™加入到 100 μL 150 mmol/L NaCl 溶液，混合均匀，室温放置 5 min；取 6 μL Novel-31* mimics 及 6 μL 阴性对照（NC）分别溶于 100 μL 150 mmol/L NaCl 溶液，混匀，室温静置 5 min；将转染试剂混合液分别加到 Novel-31* 混合液和 NC 混合液中，轻轻混匀，室温放置 20 min，以便形成转染复合物；将 200 μL 转染复合物加到 6 孔板的培养基中，轻柔摇晃细胞培养板混匀。将家蚕 BmN 细胞放置恒温培养箱 26℃ 培养，分别于 24，48 和 72 h 后收集细胞，提取总 RNA，按照 1.7 节方法检测 BmN 细胞溶血素基因表达变化。Novel-31* mimics 和 NC 分别设 3 个重复。

2 结果

2.1 Novel-31* 靶基因预测

家蚕 miRNA Novel-31* 是前期研究在 BmCPV 感染的家蚕中肠中发现的差异表达 miRNA 之一，其序列为 CTATACACTACCGTTACCGGC（Wu *et al.*, 2013）。使用靶基因预测软件进行 Novel-31* 的靶基因预测，发现 Novel-31* 与家蚕溶血素基因（GenBank 登录号：NM_001111347.1）的 5′UTR 端存在结合部位，且结合自由能低于 −20 kcal/mol，因此确定溶血素基因是 miRNA Novel-31* 可能的靶基因（图 1）。溶血素基因属于昆虫凝集素类，参与昆虫免疫过程。

```
mfe: −28.0 kcal/mol
Hemocytin   5′   A          CA          3′
                  CGGUAAC   UAGUGUAUAG
                  GCCAUUG   AUCACAUAUC
Novel-31*   5′  CG          CC          3′
```

图 1　Novel-31* 靶基因预测

Fig. 1　Prediction of Nove-31* target gene

2.2 家蚕 5 龄幼虫感染 BmCPV 后血淋巴及中肠中 Novel-31* 的表达水平

家蚕 5 龄幼虫感染 BmCPV 后，不同时间点取家蚕血淋巴与中肠，提取总 small RNA 反转录，通过 Stem-loop qRT-PCR 检测 Novel-31* 在不同时间点的表达情况，采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析数据。结果表明，家蚕感染 BmCPV 后，与对照组相比，血淋巴中 Novel-31* 在 12 −96 h 均明显上调表达，且上调幅度较大（图 2：A）；而在中肠组织中，实验组与对照组 Novel-31* 的表达前期无明显差异，实验组在 96 h 表达显著提高（图 2：B），这与我们前期研究进行的小 RNA 测序结果一致（Wu *et al.*, 2013）。

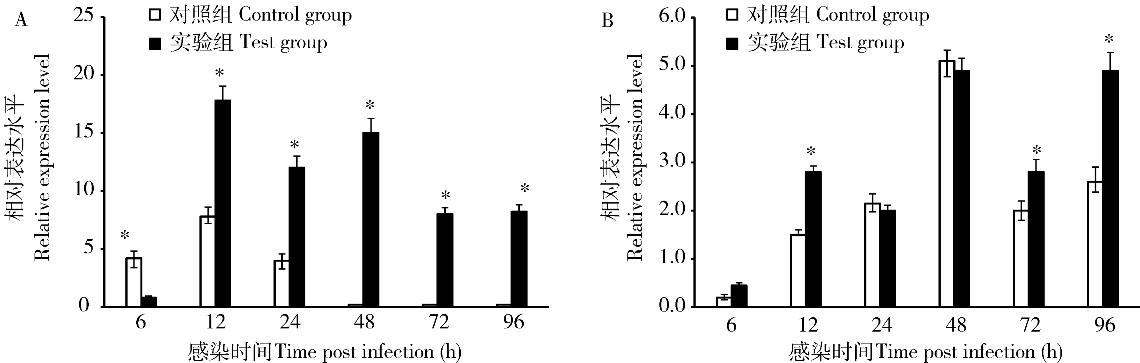


图 2　家蚕 5 龄幼虫感染 BmCPV 后 Novel-31* 在血淋巴（A）和中肠（B）中的表达谱

Fig. 2　Expression patterns of Novel-31* in hemolymph (A) and midgut (B) of the 5th instar larvae of *Bombyx mori* after infection by BmCPV

对照组添食生理盐水，实验组添食感染 BmCPV。在同一感染时间的对照组和实验组之间的数据进行 *t* 检验分析，星号表示差异显著（$P<0.05$）。图 3 同。Saline solution is used as the control group, and BmCPV-infected is as the test group. Data between the control group and the test group at the same infection time were analyzed using Student's *t*-test and the asterisk above bars indicates significant difference ($P<0.05$). The same for the Fig. 3.

2.3 家蚕 5 龄幼虫感染 BmCPV 后血淋巴及中肠中溶血素基因的表达水平

家蚕 5 龄幼虫感染 BmCPV 后,不同时间点取家蚕血淋巴及中肠,提取总 RNA 反转录,通过实时荧光定量 PCR 检测溶血素基因在不同时间点的表达情况,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析数据。结果表明,家蚕感染 BmCPV 后,与对照组相比,血淋巴中溶血素基因在 12 – 72 h 均呈明显上调表达,96 h 差异不明显(图 3: A); 而在中肠组织溶血素基因的表达无明显差异(图 3: B)。

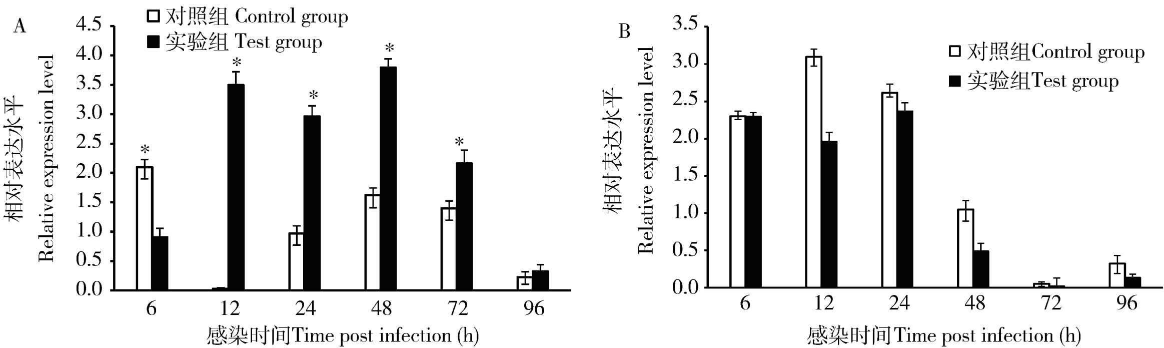


图 3 家蚕 5 龄幼虫感染 BmCPV 后溶血素基因在血淋巴(A)和中肠(B)中的表达谱

Fig. 3 Expression patterns of hemocytin gene in hemolymph (A) and midgut (B) of the 5th instar larvae of *Bombyx mori*

2.4 载体 pLNHX-UTR-GST 及 pLKO. 3G-miR-N31* 的构建与细胞转染效率

将靶基因的 5′UTR 152 bp 片段与 GST 标签 676 bp 片段插入到慢病毒载体构建得到重组质粒 pLNHX-UTR-GST, 使用限制性内切酶 *Not* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 酶切该重组质粒,得到约 828 bp 的目的片段(图 4: A),进一步测序结果显示重组质粒构建成功。miRNA 慢病毒表达载体 pLKO. 3G-miR-N31* 由体外合成的 Novel-31* 前体序列及其反义链退火形成的双链片段插入载体构建而成(图 4: B),测序显示重组质粒构建成功。将重组质粒 pLNHX-UTR-GST 和 pLKO. 3G-miR-N31* 分别转染 293T 细胞。pLNHX-UTR-GST 转染 293T 细胞后提取总 RNA 反转录,RT-PCR 检测表明该质粒成功转入 293T 细胞,且稳定表达;由于重组质粒 pLKO. 3G-miR-N31* 带有报告基因 EGFP,转染 293T 细胞后,在荧光显微镜下能够看到带绿色荧光的细胞(图 5: A),表明 pLKO. 3G-miR-N31* 也成功转染 293T 细胞,转染效率达到 60%。

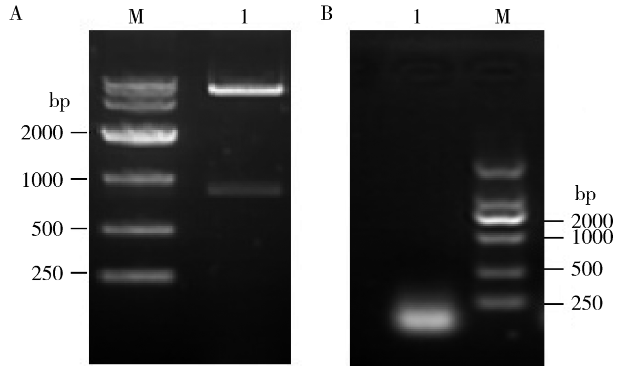


图 4 miRNA 和靶基因慢病毒载体构建检测

Fig. 4 Verification of expression vectors

A: pLNHX-UTR-GST 双酶切 Double enzymatic digestion of pLNHX-UTR-GST. M: DNA 分子量标准物 DNA molecular weight marker; 1: pLNHX-UTR-GST 双酶切片段 Double digested fragments of pLNHX-UTR-GST. B: Novel-31* 前体双链 DNA 电泳检测 Detection of double-stranded DNA of Novel-31* precursor. M: DNA 分子量标准物 DNA molecular weight marker; 1: Novel-31* 前体双链 DNA (Double-stranded DNA of Novel-31* precursor).

2.5 Novel-31* 对靶基因表达的调控效果

通过生物信息学预测,本实验将 Novel-31* 与溶血素基因 5′UTR 可能的结合部位构建在 GST 标签的 5′端,通过检测 GST 标签的表达,来检测 Novel-31* 对溶血素基因的调控作用。293T 细胞转染重组质粒 pLNHX-UTR-GST 24 h 后,转染 Novel-31* 表达载体 pLKO. 3G-miR-N31*,分别于 24 及 48 h 后收集细胞,提取总 RNA 反转录,通过实时荧光定量 PCR 检测 GST 标签在不同时间点的表达情况,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析数据。结果表明,对照组转染重组质粒 pLNHX-UTR-GST 及空质粒 pLKO. 3G 后,两个时间点 GST 标签均稳定表达,实验组转染 pLNHX-UTR-GST 及 pLKO. 3G-miR-N31* 后,GST 标签基因表达均上调,且上调表达显著,说明 Novel-31* 能与溶血素基因 5′UTR 结合,且能上调溶血素基因的表达(图 6)。

2.6 Novel-31* mimics 对 BmN 细胞靶基因表达的调控效果

为了进一步证明 Novel-31* 对家蚕溶血素基因表达的调控作用,合成了 Novel-31* mimics 及阴性对

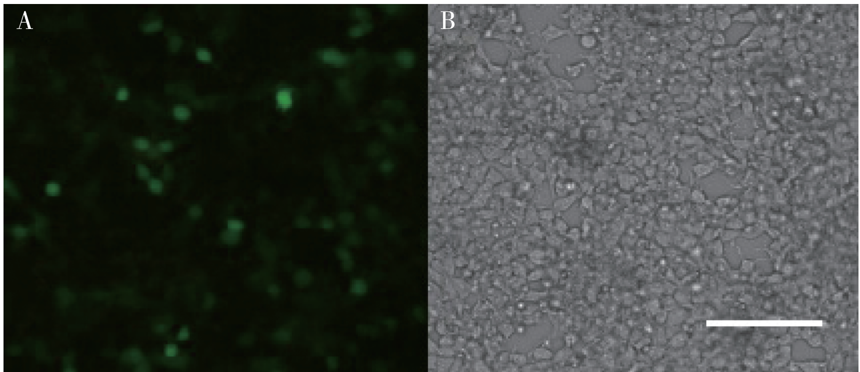


图 5　pLKO. 3G-miR-N31* 转染 293T 细胞

Fig. 5　293T cells transfected with pLKO. 3G-miR-N31*

A：荧光显微镜 Fluorescent microscope；B：普通光学显微镜 Light microscope. 标尺 Scale bar = 100 μm.

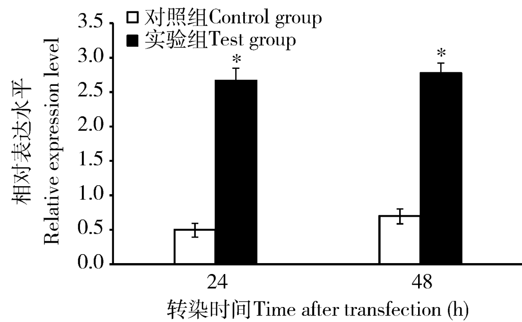


图 6　Novel-31* 对报告基因 *GST* 的表达调控

Fig. 6　Regulation on expression of reporter gene *GST* by Novel-31*

对照组为 pLNHX-UTR-GST + pLKO. 3G ，实验组为 pLNHX-UTR-GST + pLKO. 3G-miR-N31*。在同一转染时间的对照组和实验组之间的数据进行 *t* 检验分析，星号表示差异显著（$P < 0.05$）。pLNHX-UTR-GST + pLKO. 3G is used as the control group, and pLNHX-UTR-GST + pLKO. 3G-miR-N31* is as the test group. Data between the control group and the test group at the same transfection time were analyzed using Student's *t*-test and the asterisk above bars indicates significant difference（$P < 0.05$）.

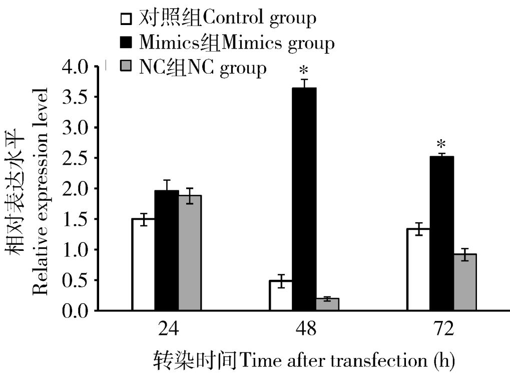


图 7　Novel-31* mimics 对家蚕 BmN 细胞溶血素基因表达的调控作用

Fig. 7　Regulation on expression of hemocytin gene by Novel-31* mimics in BmN cells

对照组为转染试剂 NEOFECT™ + NaCl 溶液；Mimics 组为 mimics + 转染试剂 NEOFECT™ + NaCl 溶液；NC 组为 NC + 转染试剂 + NaCl 溶液。在同一转染时间的对照组与实验组之间的数据进行 *t* 检验分析，星号表示差异显著（$P < 0.05$）。Transfection reagent NEOFECT™ + NaCl is used as the control group, mimics + NEOFECT™ + NaCl is as the mimics group, and NC + NEOFECT™ + NaCl is as the NC group. Data between the control group and the mimics group or NC group at the same transfection time were analyzed by Student's *t*-test, and the asterisk above bars indicates significant difference（$P < 0.05$）.

照（NC）序列，分别转染家蚕 BmN 细胞转染，分别于 24，48 和 72 h 后收集细胞，通过 qRT-PCR 检测家蚕溶血素基因在不同时间点的表达情况。结果表明，实验组与对照组相比，溶血素基因在转染 Novel-31* mimics 后 48 h 呈现显著的上调表达，至 72 h 时该基因仍然呈上调表达，但上调表达水平有所下降，可能是由于人工合成的 mimics 发生降解所致；NC 组与对照组相比，溶血素基因表达均无明显差异。直接证实了 Novel-31* 对溶血素基因表达的正调控作用（图 7）。

3　讨论

miRNA 是生物体产生的单链小 RNA 分子，通过与 mRNA 的结合，调控生物的多种生理过程（Carrington and Ambros，2003）。众所周知，miRNA 大多与靶基因 3′UTR 结合，负调控靶基因的表达（Li *et al*.，2014a）。近来研究发现 miRNA 也能够与靶基因 5′UTR 结合，上调靶基因的表达。Orom 等（2008）研究发现，miRNA miR-10a 与核糖体蛋白 mRNA 序列 5′UTR 结合，增强其翻译过程，过表达 miR-10a 能够增强核糖体蛋白表达和核糖体生成过程，而抑制内源性 miR-10a 生成，导致核糖体蛋白合成减少。Mortimer 和 Doudna（2013）研究发现人肝

特异性 miRNA miR-122 与丙型肝炎病毒(HCV)的 5′UTR 有两个结合位点,且会正调控该病毒粒子的产生。Tsai 等(2009)发现小鼠受体相互作用蛋白 140(RIP140)与 miR-346 存在结合部位,且 miR-346 上调 RIP140 蛋白的表达。本研究通过生物信息学方法预测,家蚕 miRNA Novel-31* 的靶基因为家蚕的溶血素基因,且其结合位点也位于溶血素基因的 5′UTR 区域。

目前,研究家蚕 miRNA 与其靶基因的调控作用,大多采用双荧光素酶表达系统(Wang *et al.*, 2016),然而其表达具有瞬时性,结果不稳定。由于慢病毒表达载体具有转染效率高且稳定表达等特点(王淑艳和张愚, 2006),因此本实验构建慢病毒表达载体表达 UTR 及 miRNA。通过构建慢病毒表达载体 pLKO.3G-miR-N31* 和 pLNHX-UTR-GST,验证家蚕 Novel-31* 对其靶基因溶血素基因的调控作用,发现 Novel-31* 能够上调溶血素基因的表达,且结果具有稳定性。

前期研究通过小 RNA 测序,在 BmCPV 感染的家蚕中肠组织中发现了一些差异表达 miRNA,生物信息学分析表明这些差异表达的 miRNA 可能在家蚕抵御病毒感染的免疫反应中发挥作用(Wu *et al.*, 2013)。Novel-31* 是其中差异表达的 miRNA 之一。本研究实时荧光定量 PCR 检测结果进一步表明,在 BmCPV 感染的家蚕血淋巴中,不仅 miRNA Novel-31* 基因呈现明显的上调表达,同时其靶基因溶血素基因也呈现明显的上调表达,而且采用慢病毒载体在 293T 细胞内证实 Novel-31* 能与溶血素基因的 5′UTR 区域结合,进而上调溶血素基因的表达。另外,将 Novel-31* mimic 转染家蚕培养细胞,溶血素基因被上调表达,直接验证了 miRNA Novel-31* 对溶血素基因表达的调控作用。家蚕中肠组织中 Novel-31* 只在感染 BmCPV 后 96 h 呈现明显的上调表达,这与我们对 BmCPV 感染的家蚕中肠小 RNA 测序所得结果一致,但溶血素基因在家蚕中肠的表达总体上无明显差异。家蚕溶血素是昆虫凝集素的一种,参与体液免疫过程,但是目前与溶血素有关的研究报道较少(Yamakawa and Tanaka, 1999)。

本研究的结果表明,BmCPV 对家蚕的感染可以诱导 miRNA Novel-31* 的表达,miRNA Novel-31* 显著上调血淋巴中溶血素基因的表达,提示 Novel-31* 可能通过调控溶血素基因的表达来调控家蚕的体液免疫功能。前期研究发现,BmCPV 仅感染家蚕的中肠组织,在中肠细胞中复制繁殖,因此中肠组织中一些与免疫相关基因呈现差异性表达。但本研究结果发现,家蚕感染 BmCPV 后,Novel-31* 和溶血素基因在血淋巴中均呈现明显的上调表达趋势。因此,Novel-31* 和溶血素是否都与家蚕抵御 BmCPV 感染有关,还有待今后进一步进行深入研究。生物信息学预测结果表明 Novel-31* 还有其他靶基因,如热激蛋白 70(hsp70)基因(Li *et al.*, 2014b)、钙网蛋白(CRT)基因(Goo *et al.*, 2005)等,但它们的功能与昆虫免疫相关不大。本研究初步揭示 Novel-31* 对溶血素基因有调控作用,为进一步研究溶血素基因的功能提供了一定的实验依据。

参考文献(References)

Ambros V, 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006): 350–355.

Arai I, Ohta M, Suzuki A, Tanaka S, Yoshizawa Y, Sato R, 2013. Immunohistochemical analysis of the role of hemocytin in nodule formation in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Sci.*, 13: 125.

Cao J, Tong C, Wu X, Lv J, Yang Z, Jin Y, 2008. Identification of conserved microRNAs in *Bombyx mori* (silkworm) and regulation of fibroin L chain production by microRNAs in heterologous system. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(12): 1066–1071.

Carrington JC, Ambros V, 2003. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 301(5631): 336–338.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ, 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 33(20): e179.

Goo TW, Park S, Jin BR, Yun EY, Kim I, Nho SK, Kang SW, Kwon OY, 2005. Endoplasmic reticulum stress response of *Bombyx mori* calreticulin. *Mol. Biol. Rep.*, 32(3): 133–139.

He PA, Nie Z, Chen J, Chen J, Lv Z, Sheng Q, Zhou S, Gao X, Kong L, Wu X, Jin Y, Zhang Y, 2008. Identification and characteristics of microRNAs from *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 9(1): 248.

Jiang YY, 2006. A review of researches on agglutinins of Lepidoptera insects. *Entomological Journal of East China*, 15(1): 25–29. [蒋芸芸, 2006. 鳞翅目昆虫内外凝集素的研究概况. 华东昆虫学报, 15(1): 25–29]

Kotani E, Yamakawa M, Iwamoto SI, Tashiro M, Mori H, Sumida M, Matsubara F, Taniai K, Kadono-Okuda K, Kato Y, Mori H, 1995. Cloning and expression of the gene of hemocytin, an insect humoral lectin which is homologous with the mammalian von Willebrand factor. *Biochim. Biophys. Acta*, 1260(3): 245–258.

Li J, Cai Y, Ye L, Wang S, Che J, You Z, Yu J, Zhong B, 2014a. MicroRNA expression profiling of the fifth-instar posterior silk gland of *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 15: 410.

Li QR, Xiao Y, Wu FQ, Ye MQ, Luo GQ, Xing DX, Li L, Yang Q,

2014b. Analysis of midgut gene expression profiles from different silkworm varieties after exposure to high temperature. *Gene*, 549 (1): 85 – 96.

Liu Y, Yang LC, Nie ZM, Lu X, Lv ZB, Chen J, Yu W, Wu XF, Zhang YZ, 2013. Upregulation and expression of *Bombyx mori* bmo-miR-14 and prediction of its target genes. *Scientia Agricultura Sinica*, 46(6): 1263 – 1271. [刘悦, 羊兰翠, 聂作明, 陆旋, 吕正兵, 陈健, 于威, 吴祥甫, 张耀洲, 2013. 家蚕 miR-14 的上调表达与靶基因的预测分析. 中国农业科学, 46(6): 1263 – 1271]

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25(4): 402 – 408.

Mortimer SA, Doudna JA, 2013. Unconventional miR-122 binding stabilizes the HCV genome by forming a trimolecular RNA structure. *Nucleic Acids Res*., 41(7): 4230 – 4240.

Orom UA, Nielsen FC, Lund AH, 2008. MicroRNA-10a binds the 5′ UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell*, 30(4): 460 – 471.

Rao XJ, Shahzad T, Liu S, Wu P, He YT, Sun WJ, Fan XY, Yang YF, Shi Q, Yu XQ, 2015. Identification of C-type lectin-domain proteins (CTLDPs) in silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Comp. Immunol*., 53(2): 328 – 338.

Tsai NP, Lin YL, Wei LN, 2009. MicroRNA mir-346 targets the 5′-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression. *Biochem. J*., 424 (3): 411 – 418.

Wang X, Tang S, Song F, Chen C, Guo X, Shen X, 2016. Bmo-miR-2758 targets BmFMBP-1 (Lepidoptera: Bombycidae) and suppresses its expression in BmN cells. *J. Insect Sci*., 16(1): 28.

Wang SY, Zhang Y, 2006. Advances of lentiviral vectors design and application. *China Biotechnology*, 26(11): 70 – 75. [王淑艳, 张愚, 2006. 慢病毒载体的设计及应用进展. 中国生物工程杂志, 26(11): 70 – 75]

Willis JH, Wilkins AS, Goldsmith MR, 1995. A brief history of Lepidoptera as model systems. In: Goldsmith MR, Wilkins AS eds. Molecular Model Systems in the Lepidoptera. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1 – 20.

Wu P, Han S, Chen T, Qin G, Li L, Guo, X, 2013. Involvement of microRNAs in infection of silkworm with *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV). *PLoS ONE*, 8(7): e68209.

Yamakawa M, Tanaka H, 1999. Immune proteins and their gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Comp. Immunol*., 23(4 – 5): 281 – 289.

Yu X, Zhou Q, Li SC, Luo Q, Cai Y, Lin WC, Chen H, Yang Y, Hu S, Yu J, 2008. The silkworm (*Bombyx mori*) microRNAs and their expressions in multiple developmental stages. *PLoS ONE*, 3 (8): e2997.

（责任编辑：袁德成）